



求愛行動を司る雄特異的神経回路の形態形成制御の分子基盤の解明

著者	後藤 純平
号	8
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第195号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60067

ごとう じゅんぺい

氏名（本籍地）	後藤 純平
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第 195 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	求愛行動を司る雄特異的神経回路の形態形成制御の分子基盤の解明
博士論文審査委員	（主査） 教授 山元 大輔 教授 仲村 春和 准教授 舟橋 淳一

生物は、求愛に始まる繁殖行動、採餌行動、攻撃と逃避行動、営巣と養育、これらに連動した縄張り形成や回遊など実に多種多様な行動を示す。「何故そのように行動するのか」という問いは生物学上の主要なテーマの一つであり、それゆえに古くから多くの研究者が生物の行動に興味をもち様々な研究を行ってきた。現在では、分子生物学とりわけ遺伝子解析技術の進歩によって、生物が示す行動、特に生得的行動（本能行動）が、特定の遺伝子（群）とそれ（ら）によって規定される神経ネットワークの働きによって生み出されている事が明らかになりつつある。しかし、個々の遺伝子間の相互作用がどのように神経ネットワークの機能に反映され、行動の実行へと帰結するのかについてはいまだに不明な点が多い。

本研究の発端となったのは、行動遺伝学の最良のモデル生物の一つであるキョウロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）の性行動の解析である。20年余り前に、性行動に異常を示す突然変異体の探索によって雄が同性愛行動を示す *satori* 変異体が単離された。その後、その原因遺伝子である *fruitless* (*fru*) 遺伝子がクローニングされている。*fru* は中枢神経系に発現しており、一部の *fru* 発現ニューロン群には構造的性差がみられることが比較的最近、発見されるに至った。そして、*fru* 機能喪失変異体の雄では、そうしたニューロンが雌化している。したがって、*fru* は、神経系の雄化因子として機能し、雄の求愛行動を司る雄特異的神経回路の形成に必要不可欠であるといえる。しかし、その作用の分子機構については不明な点が多い。そこで、第一部では、ショウジョウバエ中枢神経系で性差を示す *fru* 発現ニューロンの形態的性差を生み出す分子基盤の解明を試みた。さらに、第二部では、本研究によって新たに見出した *fru* 発現ニューロンの雄特異的形態を報告すると共に、求愛行動を規定する神経回路網の形成に関わる分子基盤について論じたい。これらを通して、動物の本能行動が遺伝的にどのように規定されているのかという壮大な問いに答える第一歩を踏み出したいと思う。

第一部

fruitless による神経細胞雄性化に協調して働く因子の同定とその機能的相互作用の解析

「背景」

ショウジョウバエの脳内には、細胞数や神経線維の投射パターンに性差を示す神経細胞群がある。性差を示す神経細胞の中で、もっとも解析が進んでいるのが *mAL* と呼ばれる

介在ニューロン集団である。この mAL ニューロンは、三つの点で明瞭な性差を示す。第一に、脳半球あたりの細胞数が雄では 30 個であるのに対して、雌の脳内ではわずかに 5 個しか存在しない。第二に、雄の mAL ニューロン群は正中線を挟んで左右両側に神経突起を形成し、食道下神経節に向かって投射するのに対して、雌の mAL ニューロン群は細胞体と反対側にのみ神経突起の投射がみられる。第三に、細胞体があるのとは反対側に投射している神経線維先端部の形状が、雄では馬の尾状、雌では Y 字型である。*fru* 機能喪失変異体の雄では、mAL ニューロンは雌型の特徴を示す。このことから、*fru* 機能は、神経細胞の雄性化であるといえる。Fru タンパク質は、タンパク質間相互作用を担う BTB ドメインと DNA 結合配列である Zn フィンガードドメインをもっている。このことから、Fru タンパク質は他のタンパク質と複合体を形成し、転写因子として下流の遺伝子の転写調節に働いている事が予想される。したがって、*fru* による神経細胞雄性化の分子機構の解明には、*fru* と機能的に相互作用を示す因子の同定が不可欠である。しかしながら、これまでにそのような因子はいまだ報告されていない。そこで本研究では、*fru* によるショウジョウバエ中枢神経系の性差形成に協調して働く遺伝子の同定を目的として、*fru* 機能を修飾する遺伝子の探索を行った。

「結果」

fru による神経雄性化に協調して働く遺伝子を同定する為に、複眼特異的な *fru*⁺ 強制発現によって生じた粗眼形質を修飾する突然変異を探索することを試みた。435 系統の突然変異系統を試験し、そのうちの 21 系統が修飾作用を示した。その中の 1 系統は *gap* 遺伝子の一つである *hunchback* (*hb*) 変異アリルをもっていた。後胚発生期において *fru* と *hb* が神経細胞において機能的に相互作用している可能性を検討する為に、抗 Fru 抗体および抗 Hb 抗体を用いて、蛹期の雄の脳及び胸腹部神経節の免疫組織化学染色を行った。その結果、ほぼすべての Fru タンパク質発現細胞において Hb タンパク質との核における共局在が認められた。次いで、MARCM 法によって mAL ニューロンモザイククローンに、*hb* mRNA に相補的なヘアピン型二本鎖 RNA を強制発現させ、RNA 干渉法により *hb* 遺伝子のノックダウンを行った。そして、その時の mAL ニューロンの形態に及ぼす影響を調べた。その結果、雄の反対側神経突起先端部の投射パターンが雄特異的な馬尾状から雌特異的な Y 字型に似た形態を示した。

「結論」

本研究によって、*hb* が mAL ニューロンの形態的性差の形成に *fru* と協調して働いている事が明らかになった。これまで、*fru* によるニューロンの性決定に関わる因子に関する研究はほとんど進んでいない。そのなかにあつて、具体的な遺伝子を同定し、ニューロンの性差形成における機能的相互作用を明らかにした意義は極めて大きい。しかしながら、*fru* と *hb* の相互作用の基盤をなす分子機序や標的遺伝子の実態はいまだ不明なままである。これらの課題を解決することで、性行動の分子基盤の包括的な解明につながるものと考えている。

第二部

雄特異的神経回路網形成の分子機構の解明

「背景」

ショウジョウバエの雄の求愛行動は、定型的な運動パターンの連続によって構成されている。すなわち、定位・タッピング・求愛歌・リッキング・交尾試行という行動ステップを経て交尾に至る。これまでに、性モザイク解析によって、各運動パターンを制御していると考えられる中枢神経系の領域がマッピングされている。この結果は、それらの領域に解剖学的・機能的な違いが雌雄で存在することを示唆している。実際に、雄の求愛行動のマスター遺伝子である *fru* を発現している神経細胞のうち、*fru^{NP21}-Gal4* を用いて標識される一部の介在ニューロン集団には、明瞭な形態学的・機能的性差がある。たとえば、mAL ニューロン群は細胞数やその投射パターンに性差を示す。この他にも、aSP2, aSP3, M, mcAL, P2, P4, pL と呼ばれる介在ニューロン集団に細胞数の性差が認められている。しかし、これらの細胞集団に関しては、細胞数以外の性差について形態学的・機能的な研究はほとんど行われていない。その中にあつて、mcALa ニューロン群については、求愛行動における機能が示唆されている。すなわち、mcALa ニューロンを内包する median bundle neurons と呼ばれる介在ニューロン集団の *fru* 機能を RNA 干渉法によって抑制した雄個体では、求愛行動の際に見られる定型的運動パターンのうち、定位とタッピングが失われ、求愛歌・リッキング・交尾試行の行動パターンが同時に出現する。これは、雄の求愛行動を構成する各行動パターンを正しい順序で適切に発現するうえで、mcALa ニューロンが重要な機能を担っていることを示唆している。さらに、形態的にも機能的にも mcALa ニュ

ニューロンに性差があることが予測されるが、いまだそのような報告はない。そこで本研究では、細胞数以外にも mcALa ニューロンに形態的性差があるか否かを詳細に解析し、求愛行動の性特異的行動に寄与しうるか否かを調べた。

「結果」

MARCM 法によって mcALa ニューロンの神経芽細胞クローンを作成し、雌雄で形態を詳細に比較した。その結果、雄の mcALa ニューロンは、細胞体近傍の神経線維から伸びる独立の神経突起をもっていた。この神経突起は、雌の mcALa ニューロンには認められなかった。また、*fru* 機能喪失変異体の雄の mcALa ニューロンにおいても、この神経突起の形成は認められなかった。これらの結果から、この mcALa ニューロンに見られる神経突起は雄特異的であり、形成には *fru* 機能が必要であることが示唆された。さらに、雌の脳内に、雌化因子である *transformer (tra)* 機能欠失 mcALa 神経芽細胞クローン (*tra¹/tra¹*) を作成し、その時の雄特異的神経突起の有無を調べた。この場合、クローンとなった mcALa ニューロン群は *tra⁺* を失って雄化するが、その周囲の他のニューロン群は雌のままである。その結果、作成された *tra* 機能欠失 mcALa 神経芽細胞クローンは、Fru タンパク質を発現し雄性化していた。しかし、雄特異的神経突起の形成は認められなかった。このことから、mcALa ニューロンの雄特異的神経突起は、*fru* によって細胞非自律的に形成される可能性が示唆された。

「結論」

本研究によって、*fru* 発現介在ニューロンの一つである mcALa ニューロンに形態的性差が存在することを新たに見出した。さらに、この形態的性差は細胞非自律的に形成されることを示唆する結果が得られた。これは、性特異的な神経回路網が *fru* 発現ニューロン同士の間で相互作用によって形作られている事を物語っている。性差形成の分子機構の研究や求愛行動における機能の研究は、そのほとんどが個々のニューロンに焦点を当てたものである。したがって、本研究によって得られた知見は、求愛行動を制御する神経回路網がどのように形成されるのかを理解する上で欠かせない発見となるであろう。

論文審査結果の要旨

本研究は、キイロショウジョウバエの脳に性的二型を生み出し、行動の性差をもたらす遺伝子、*fruitless* (*fru*) の作用機構を細胞、分子レベルで解明しようとするものである。

まず始めに、*fru* を複眼に異所発現させ *fru* 優性表現型を惹起し、それを修飾する遺伝子の同定を試みた。続いて、顕著な構造的性差を示す *fru* 発現介在ニューロングループである mAL の性分化に果たすその因子の役割を検討することにより、*fru* の作用機構の理解を目指した。さらに mAL のシナプス標的と推定される mcALa の性差形成機構についても解析した。

スクリーニングの結果、*fru* による複眼形成異常を優性に抑圧する変異として、胚発生過程にはたらくギャップ遺伝子群の一つ、*hunchback* (*hb*) が得られた。蛹期の中樞神経系では、mAL を含むほとんど全ての *fru* 発現ニューロンが Hb タンパク質を発現しており、*fru* と *hb* の相互作用が予測された。mAL の性差は、クラスターを構成する細胞数、同側突起の有無、反対側突起先端の分枝パターンの3点に認められる。雄個体に於いて、二本鎖 RNA を用い *hb* 遺伝子機能を mAL ニューロンに限定してノックダウンすると、正常な雄型の構造を持った mAL ニューロンに加えて、雄固有の同側神経突起を持ちつつ反対側神経突起の先端が雌様に分岐した雌雄中間的形態を示す mAL ニューロンが生じることが明らかとなった。この結果から、Hb タンパク質が mAL ニューロンで細胞自律的に働き、反対側神経突起に雄型の形状を発達させると結論した。

これとは別に、mAL からシナプス入力を受けることが推定される mcALa ニューロン群に、従来知られていない雄特異的樹状突起が存在することを見出した。雌を雄に性転換させる作用のある *tra* 変異についてホモ接合の雌では、この雄特異的突起が形成される。しかし、雌の脳に *tra* 変異ホモ接合の mcALa ニューロンクローンを作り出し、このクローンのみ雄化させた場合には、雄特異的突起は形成されなかった。つまり、mcALa ニューロンの雄特異的突起は、この細胞自身の性には依存せず、mcALa 以外のいずれかの細胞が雄であることに依存して細胞非自律的に生じると考えられる。

昆虫の性決定は細胞自律的であり脊椎動物に於ける細胞非自律的な性決定の対極に位置する、というこれまでの見方に、本研究は変更を迫る内容を含んでおり、極めて独創的である。このことは、後藤純平が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、後藤純平提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。